

ALGUNOS ENSAYOS SOBRE PRODUCCION DE VACUNAS ANTIAFTOSAS INACTIVADAS,  
A PARTIR DE VIRUS MULTIPLICADO EN CONEJOS NEONATOS

Dr. Daniel Abaracón\*

1. INTRODUCCION

El uso de virus aftoso multiplicado en gazapos lactantes para la producción de vacunas inactivadas fue referido por varios autores (1) a (7) algunos años atrás. A pesar del tiempo transcurrido desde entonces, la bibliografía sobre el tema es particularmente escasa, incompleta y a veces reticente y contradictoria.

En el Brasil, durante los últimos años estas técnicas tomaron un desarrollo industrial de gran importancia, llegando en el año 1970 a cubrir un 70% de la producción nacional de vacunas. Las técnicas de producción seguidas por los distintos laboratorios industriales eran un tanto empíricas, adoptadas en general por analogía con otros métodos de producción, Frenkel, Waldmann, etc.

La falta de información sobre la verdadera eficacia inmunogénica de los virus multiplicados en gazapos lactantes era casi total. Solamente el Instituto Biológico de São Paulo había realizado alguna prueba con vacunas experimentales, sobre pocos bovinos, con resultado alentador. El comportamiento de las vacunas en el campo no era satisfactorio frente a los virus actuantes en ese momento.

Frente a esa situación, se decidió realizar en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa algunas experiencias, buscando obtener respuestas prácticas para las principales interrogantes planteadas en torno a este tipo de vacunas.

2. MATERIAL Y METODOS

*Gazapos*

Se utilizaron gazapos de 3 a 5 días de edad producidos en el Centro. En algunos ensayos se usaron varios centenares de gazapos que fueron facilitados por el Instituto de Pesquisas Veterinarias "Desidério Finamor".

Los gazapos fueron inoculados por vía intramuscular o intraperitoneal y luego conservados a temperatura próxima a 26° C, separados de sus madres. Cuando las cepas de virus están adaptadas, las muertes de los gazapos ocurren entre 20 y 30 horas. A medida que mueren se pasan a un congelador a -20° C donde son conservados hasta el momento del proceso del material.

*Cepas de virus*

Se utilizaron las cepas de virus A<sub>24</sub> (cepa Cruzeiro), O<sub>1</sub> (cepas Campos y Brasil 70), C<sub>3</sub> (cepa Resende) y C<sub>2</sub> (cepa Pando). La adaptación se comenzó a partir de virus cultivado en BHK de muy bajo número de pases. En general se logró buena adaptación al conejo entre el tercero y sexto pase en esta especie. Los primeros pases de los virus A<sub>24</sub> y O<sub>1</sub> Brasil 70 fueron facilitados por inoculación previa de los gazapos con 1 ml de metilcortelona Schering (25 g de acetato de prednisolona) por vía subcutánea.

*Suspensión virulenta*

Se preparó a partir de la carcasa de los gazapos, desprovistos de vísceras abdominales,

\* Consultor de Vacunas, Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589 ZC-00, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

cuero y cabeza. En un ensayo se usó todo el cuerpo del gazapo eliminando únicamente las vísceras abdominales y extremos de las patas.

Como diluyente se usó solución salina bufferada con buffer de fosfato 0,04 M a pH 7,6 o agua destilada con 0,25% de buffer glicocola, elaborado de acuerdo con la siguiente fórmula: hidróxido de sodio - 50,5 g; cloruro de sodio - 100,4 g; glicocola - 158,0 g, y agua destilada c.s.p. 1.000 ml, pH 9,8 a 10,2.

Luego de algunos ensayos preliminares se estableció como técnica provisoria para los ensayos de vacunas el siguiente procedimiento:

Suspensión del material virulento del 15 al 20% en uno de los diluyentes anteriores, adición de cloroformo al 5% y trituración en un aparato Waring Blendor, centrifugación por 30 minutos a 2.500 revoluciones por minuto (aproximadamente 1.300 g). Nuevo tratamiento del sobrenadante por 2,0% de cloroformo en el Waring Blendor y nueva centrifugación igual a la anterior.

#### *Inactivantes*

La inactivación fue efectuada por tratamiento con formalina MERCK (37% de formaldehído) al 0,08%, a 26° C durante 48 horas, sobre la mezcla suspensión virulenta/hidróxido de aluminio, o por acetilileneimina al 0,05%, a 37° C durante 24 horas, sobre la suspensión virulenta.

#### *Prueba de inocuidad*

La prueba de no infectividad se realizó en todos los casos en no menos de 100 ratones lactantes por inoculación intramuscular con 0,05 ml de mezcla virus/hidróxido en el caso de inactivación por formalina, o de suspensión vírica inactivada en el caso de inactivación por AEI.

También con las suspensiones víricas inactivadas con AEI se inocularon 4 cultivos de células BHK en botellas de Roux, con 5 ml de virus inactivado y se realizaron tres

pases sucesivos con 48 horas de intervalo. El líquido del último pase fue sometido a prueba de fijación del complemento e inoculación en 2 grupos de 8 ratones lactantes.

Los resultados fueron en todos los casos: vacuna inocua.

#### *Adyuvantes*

Se usó hidróxido de aluminio con una concentración de 2,0% expresado en  $Al_2O_3$ , en los volúmenes indicados en cada experimento.

Se usó saponina de Food Industries Ltd., partida PQ7-7/7/69. Esta partida ya fue experimentada anteriormente en cuanto a su eficacia como adyuvante.

#### *Pruebas de adsorción del hidróxido de aluminio*

Cada partida de hidróxido de aluminio producida, es sometida a ensayo en cuanto a su poder adsorbente sobre el virus contenido en una suspensión vírica preparada como las suspensiones víricas para usar en vacunas. La prueba consiste en mezclar una cantidad de hidróxido de aluminio a pH 8,0 con la suspensión vírica sin inactivar. El volumen de hidróxido de aluminio en esta mezcla es de 20 a 40% del total. Se deja en contacto bajo agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Cumplido ese plazo se toma una muestra de esa mezcla y se guarda a 4° C durante el tiempo necesario para que otra muestra igual sea sometida a una centrifugación en centrífuga refrigerada por 30 minutos a 2.500 revoluciones por minuto (aproximadamente 1.300 g). Luego se corren dos titulaciones simultáneas de la mezcla total (muestra 1) y del líquido sobrenadante de la muestra centrifugada (muestra 2). Se acepta en general que un buen hidróxido de aluminio debe dar una diferencia entre ambos títulos de por lo menos 3 unidades logarítmicas.

#### *Bovinos*

Se usaron 194 bovinos de raza Hereford, nunca vacunados ni expuestos a contacto con fiebre aftosa, de edad entre 15 y 20 meses en

el momento del comienzo de las pruebas y con un peso de aproximadamente 250 kg. Los bovinos constituían un grupo homogéneo, criados en un establecimiento libre de fiebre aftosa por más de 9 años y en ese mismo establecimiento fueron mantenidos durante las pruebas. La integración de los grupos de bovinos adjudicados a cada vacuna se hizo en todos los casos por un riguroso sistema de distribución al azar por sorteo. Cada grupo tenía desde un mínimo de 8 bovinos hasta un máximo de 16. Los bovinos fueron sangrados antes de vacunar y varias veces después de la vacunación o revacunación, según la frecuencia indicada en cada experiencia. La estimación de inmunidad se hizo por medición de anticuerpos circulantes por la técnica del Índice de Seroprotección, de R. CUNHA *et al.* (8).

#### *Ensayos de conservación de las vacunas y del material vírico*

Para estos ensayos las vacunas envasadas fueron conservadas en cámara fría a temperatura de 4° C y el virus (pasta de conejo) fue conservado en congelación a temperatura de -20° C en congeladoras del mismo tipo de las usadas por la industria.

### 3. RESULTADOS

#### ENSAYOS PRELIMINARES

##### *Adaptación de las cepas de virus*

La adaptación de los virus a conejos lactantes se logró fácilmente y en pocos pases. Una vez que las cepas se han adaptado, e inoculando los gazapos por vía intramuscular o intraperitoneal, se produce la muerte entre las 20 y 36 horas, luego de presentar los síntomas característicos. Los títulos infectantes obtenidos, ya sea en titulación en ratones lactantes o en cultivos celulares en tubos o por formación de placas fueron, en todas las cepas de virus estudiadas, consistentemente elevados. Los títulos de fijación del

complemento también fueron consistentemente elevados. El Cuadro 1 muestra algunos ejemplos de adaptación.

##### *Condición general de los gazapos en el momento de la inoculación*

Se encontraron grandes diferencias entre los títulos de los virus obtenidos cuando fueron multiplicados en gazapos en excelente estado nutritivo y con buena vitalidad y cuando los mismos virus fueron inoculados a gazapos en mal estado nutritivo (Cuadro 2).

En algunos ensayos en los que se inoculó simultáneamente una mitad de la camada y se dejó separada de la madre, y la otra mitad se dejó con la madre, no se observó diferencia en el tiempo necesario para producir la muerte, ni en el título de los virus obtenidos en ambos grupos.

##### *Distribución del virus en los diferentes órganos*

No se hicieron estudios sistemáticos de la distribución del virus en los diferentes órganos, pero en algunos ensayos se encontró que la carcasa y los órganos torácicos, presentan los mayores títulos infectantes y fijadores del complemento.

#### PREPARACION DE LA SUSPENSION VIRICA

##### *Cloroformo*

Para obtener una suspensión límpida es esencial hacer algún tratamiento con cloroformo. Se observó que cuando el tratamiento con cloroformo se realiza simultáneamente con la trituration del material en molino coloidal, se logra una emulsificación del cloroformo en gotas más pequeñas, y con ello la suspensión final de virus resulta más límpida que cuando la trituration y tratamiento con cloroformo se realizan en un triturador Waring Blender.

##### *Diluyente*

Como diluyente para el virus se empleó:

a) solución salina bufferada con tampón de fosfatos 0,04 M, o, b) agua destilada con buffer glicocola al 0,25%. Ambos son apropiados para realizar la suspensión y mantener un pH adecuado. Si se desea congelar la suspensión para ser usada como virus de inoculación o para titulaciones posteriores, no se podrá usar el buffer de fosfatos porque el título del virus cae mucho (Cuadro 3), debido a la inestabilidad de ese sistema buffer durante el proceso de congelación.

#### Contenido proteico

En las suspensiones para vacunas preparadas de acuerdo con la técnica descrita en MATERIAL Y METODOS, se encontraron los valores de contenido proteico que se presentan en forma comparativa con los valores de suspensiones de virus Frenkel y BHK en el Cuadro 4.

#### Adsorción del virus por el hidróxido de aluminio

El hidróxido de aluminio, además de ser usado en la producción de vacunas por su acción adyuvante, es también muy usado como elemento de concentración del virus. En el primer caso, el poder adsorbente es fundamental porque la acción adyuvante del hidróxido de aluminio reposa en gran parte en su lenta elución de virus cuando la vacuna es inoculada. En el segundo caso es también fundamental porque la concentración se basa en adsorción del virus por el hidróxido de aluminio, seguida de sedimentación y ulterior eliminación del líquido sobrenadante que debe estar casi totalmente desprovisto de virus.

Se hicieron algunos ensayos de adsorción de virus, preparando la suspensión vírica como se hace en muchos laboratorios industriales, es decir, suspensión de pasta de conejo

CUADRO 1. Adaptación de virus a conejo lactante

Cepa virus	Pase	F.C'	T.R.L. b)	T.C.T. c)
		90' y 3 u C'a) (Susp. 1/10)	(Susp. 1/10)	(Susp. 1/10)
O <sub>1</sub> (Brasil 70) En los primeros pases se usó metilcortelona 5 mg/gazapo	1	1/3	10 <sup>5,1</sup> /ml	
	2	1/8	10 <sup>8,3</sup> /ml	
	3	1/15	10 <sup>8,8</sup> /ml	10 <sup>8,3</sup> /ml
	4	1/6	10 <sup>7,96</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml
	5	1/20	10 <sup>7,9</sup> /ml	10 <sup>7,9</sup> /ml
	6	1/16	10 <sup>7,8</sup> /ml	10 <sup>8,0</sup> /ml
C <sub>2</sub> (cepa Pando)	1	1/9	10 <sup>6,6</sup> /ml	
	2	1/30	10 <sup>7,7</sup> /ml	
	3	1/45	10 <sup>8,0</sup> /ml	

- a) F.C': Los títulos de fijación del complemento se refieren a la suspensión de virus al 1:10. En las técnicas de fijación del complemento se realiza el contacto suero/virus durante 90 minutos y se usan 3 unidades de complemento 50%.
- b) T.R.L.: Dosis infectantes 50% por ml de suspensión vírica, sobre ratones lactantes de 6 a 8 días de edad.
- c) T.C.T.: Dosis infectantes 50% por ml de suspensión vírica, evaluada por efecto citopático en cultivos celulares de células BHK-21 en tubos.

CUADRO 2. *Condición general de los gazapos*

Virus (susp. 1/10)	Pase	Gazapos/Edad	F.C'	T.R.L.	T.C.T.
O <sub>1</sub>	5	débiles - 4 días	1/2	10 <sup>7,3</sup>	10 <sup>6,56</sup>
		fuertes - 4 días	1/20	10 <sup>7,9</sup>	10 <sup>7,95</sup>
C <sub>3</sub>	3	débiles - 4 días	1/32	10 <sup>7,5</sup>	10 <sup>7,0</sup>
		fuertes - 4 días	1/50	10 <sup>8,9</sup>	10 <sup>8,1</sup>
O <sub>1</sub>	4	débiles - 5 días	Neg.	10 <sup>6,3</sup>	10 <sup>5,8</sup>
		fuertes - 4 días	1/6	10 <sup>7,9</sup>	10 <sup>7,6</sup>

CUADRO 3. *Líquido de extracción. Conservación de la suspensión vírica en buffer glicocola o en salina bufferada 0,04 m. Virus C Resende integral, suspensión al 20%. Doble tratamiento con cloroformo.*

Conservación	Solución			
	Salina bufferada 0,04 M - pH 7,6		Buffer glicocola 0,25%	
	T.C.T.	T.R.L.	T.C.T.	T.R.L.
18 horas a 4° C	10 <sup>7,5</sup> /ml	10 <sup>7,3</sup> /ml	10 <sup>7,6</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml
4 días a 4° C	10 <sup>6,7</sup> /ml	10 <sup>7,7</sup> /ml	10 <sup>7,6</sup> /ml	10 <sup>6,9</sup> /ml
8 días a 4° C	-	10 <sup>6,6</sup> /ml	-	10 <sup>6,6</sup> /ml
4 días a -20° C	10 <sup>3,7</sup> /ml	10 <sup>3,2</sup> /ml	10 <sup>7,7</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml

al 20% en buffer fosfatado 0,04 M o agua destilada, y un tratamiento por cloroformo a una concentración del 4% del peso del material vírico. En estos casos la adsorción fue totalmente deficiente. El mismo hidróxido de aluminio frente a una suspensión de virus de Frenkel funcionó normalmente (Cuadro 5).

En otros ensayos, usando suspensiones víricas mejor purificadas se encontró que la adsorción se realiza en la misma forma que cuando se utilizaron suspensiones víricas de otras fuentes (Cuadro 6).

También en esos ensayos se vio claramente que cuando la suspensión vírica se hace en solución salina bufferada con buffer de fosfatos 0,04 M, este diluyente interfiere la adsorción del virus (Cuadro 7).

#### ENSAYOS CON VACUNAS

##### *Primera serie*

Este ensayo se realizó para obtener una información preliminar y de orientación para las pruebas posteriores.

*Vacuna bivalente A<sub>24</sub> - O<sub>1</sub>. Cantidades para 1 litro*

		F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml
Virus A - suspensión al 20%	250 ml	1/10	10 <sup>8,3</sup> /ml
Virus O - suspensión al 20%	250 ml	1/6	10 <sup>7,8</sup> /ml
Hidróxido de aluminio (2,0% en Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	500 ml		
Glicerina	50 ml		
Saponina (sol. al 5% a pH 8,9)	20 ml		
pH final de la vacuna	8,2		

CUADRO 4. *Contenido proteico (g x 100 ml suspensión)*

Virus	Colorimetría	Mét. Kjeldahl <sup>a)</sup>
O Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,45	0,51
A Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,55	0,55
C Conejo Susp. 15% tratado con cloroformo	0,45	0,55
Frenkel Susp. 20% tratado con cloroformo	0,40	0,49
Frenkel Susp. 20% no tratado con cloroformo	0,57	0,65
BHK no tratado con cloroformo	0,35	0,32

- a) Las determinaciones por el método de Kjeldahl fueron realizadas por el Dr. Pedro Carlos Mancuso, del Instituto de Pesquisas Veterinarias "Desidério Finamor", Porto Alegre, RS, Brasil.

CUADRO 5. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.	
		Hidróxido	
		Partida A	Partida B
Susp. virus conejo 20% (C Resende) en salina bufferada 0,04 M (1 trat. cloroformo 4%)	Mezcla virus 60%		
	hidróxido 40% .....	$10^{5,9}/\text{ml}$	$10^{6,3}/\text{ml}$
	Sobrenadante .....	$10^{5,3}/\text{ml}$	$10^{5,3}/\text{ml}$
		$\Delta = 0,6$	1,0
Susp. virus Frenkel	Mezcla virus 60%		
	hidróxido 40% .....	$10^{7,9}/\text{ml}$	$10^{7,55}/\text{ml}$
	Sobrenadante .....	$10^{3,9}/\text{ml}$	$10^{2,55}/\text{ml}$
		$\Delta = 4,0$	5,0

CUADRO 6. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.
Susp. virus conejo cepa C <sub>3</sub> al 15% en agua con buffer glicocola 0,25%	Susp. vírica .....	$10^{8,3}/\text{ml}$
	Mezcla virus 60%	
	hidróxido 40% .....	$10^{7,8}/\text{ml}$
Sobrenadante .....		$10^{2,8}/\text{ml}$
		$\Delta = 5,0$
Susp. virus conejo cepa O <sub>1</sub> al 15% en agua con buffer glicocola 0,25%	Susp. vírica .....	$10^{7,9}/\text{ml}$
	Mezcla virus 60%	
	hidróxido 40% .....	$10^{7,3}/\text{ml}$
Sobrenadante .....		$10^{2,8}/\text{ml}$
		$\Delta = 4,5$

CUADRO 7. Adsorción sobre hidróxido de aluminio

		T.R.L.	
		Suspensión en buffer de fosfatos 0,05 M      glicocola 0,25%	
Susp. virus conejo A <sub>24</sub> al 30%	Susp. vírica .....	10 <sup>7,06</sup> /ml	10 <sup>7,04</sup> /ml
	Mezcla virus 60% Hidróxido 40% .....	10 <sup>6,86</sup> /ml	10 <sup>6,80</sup> /ml
	Sobrenadante .....	10 <sup>5,8</sup> /ml	10 <sup>4,05</sup> /ml
	Δ =	1,06	2,75
Susp. virus conejo C <sub>3</sub> al 15%	Susp. vírica .....	10 <sup>7,46</sup> /ml	10 <sup>7,13</sup> /ml
	Mezcla virus 75% hidróxido 25% .....	10 <sup>6,96</sup> /ml	10 <sup>6,86</sup> /ml
	Sobrenadante .....	10 <sup>5,86</sup> /ml	10 <sup>3,85</sup> /ml
	Δ =	1,1	3,0

Los virus usados fueron suministrados por los técnicos del Grupo Ejecutivo Estadual de Combate a la Fiebre Aftosa (GECOFA) de Rio Grande do Sul, y proceden de un laboratorio industrial, estando constituidos por pasta de conejo "integral", es decir, conteniendo la carcasa, el cuero y la cabeza de los gazapos. La inactivación fue realizada por acción de AEI al 0,05%, a la temperatura de 37° C durante 24 horas. La vacuna fue usada a la dosis de 4 v 16 ml, por vía subcutánea, en sendos grupos de 8 bovinos.

Como referencia se vacunó otro grupo de 8 bovinos con una vacuna producida con virus desarrollado en células BHK en cultivos en monocamadas. Esta vacuna ya había sido anteriormente probada en cuanto a su poder inmunogénico en bovinos, con resultados satisfactorios.

El Gráfico 1 muestra los valores de los índices de seroprotección obtenidos con las

tres vacunas, en el momento de la vacunación (0 días), a los 21 y 90 días postvacunación.

#### Segunda serie

En este ensayo se produjo una mezcla tri-valente de suspensiones víricas, que luego fue dividida en 2 partes, cada una de las cuales fue sometida a diferentes procesos de inactivación, siendo una de ellas inactivada con formalina y la otra con AEI.

Las vacunas de cada grupo fueron probadas a dos niveles de dosis: 5 y 10 ml. Cuando se usó la dosis de 10 ml, el contenido antigénico y la cantidad de hidróxido de aluminio fue doble que cuando la dosis fue de 5 ml. La concentración de saponina en cambio, se graduó de tal forma que en una dosis de 10 ml la cantidad de saponina fue de 5 mg, es decir, la misma cantidad que en la dosis de 5 ml.



Como referencia se utilizaron 2 vacunas: una bivalente de BHK ya usada en la prueba anterior, y otra trivalente producida por el método de Frenkel, de acuerdo con la técnica seguida por el CPFA (9).

El detalle de las vacunas experimentales es el siguiente:

Virus (susp. al 15%)	F.C' 90' y 30 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml	T.C.T. DI <sub>50</sub> /ml	pH
O <sub>1</sub>	1/25	10 <sup>7,9</sup>	10 <sup>8,1</sup>	7,8
A <sub>24</sub>	1/15	10 <sup>8,0</sup>	10 <sup>7,8</sup>	7,8
C <sub>3</sub>	1/14	10 <sup>8,3</sup>	10 <sup>7,7</sup>	8,0

b) Vacuna inactivada con formol. Cantidades para 1 litro. Dosis 5 ml.

Virus O - suspensión al 15%	200 ml
Virus A - suspensión al 15%	200 ml
Virus C - suspensión al 15%	200 ml
Al(OH) <sub>3</sub>	400 ml

luego de dos horas de contacto,

Formalina "Fisher"	0,08%
Inactivación a 26° C durante 72 horas	
Glicerina neutra	50 ml
Saponina Food Industries (20 ml sol. al 5%, a pH 8,0)	0,1%
pH final de la vacuna	8,3

La vacuna a ser usada en la dosis de 10 ml es esta misma vacuna, pero la concentración de saponina es de solamente 0,05%.

c) Vacuna inactivada con AEI. La vacuna AEI es en un todo igual a la Vacuna Formol, con la única excepción del proceso de inactivación, que fue efectuado por adición de 0,05% de acetiltileneimina sobre la suspensión vírica y mantenida a 37° C durante 24 horas. El hidróxido de aluminio fue agregado posteriormente.

Con cada una de las vacunas se vacunó un lote de 10 bovinos. El Gráfico 2 muestra la respuesta expresada en índice de seroprotección a los 25 días postvacunación.

a) Vacunas trivalentes O<sub>1</sub> - A<sub>24</sub> - C<sub>3</sub>.

Suspensión vírica. Producida a partir de pasta de carcasa de conejos, elaborada en escala industrial. Este virus fue facilitado al CPFA por intermedio de los técnicos del GECOFA, de Rio Grande do Sul, Brasil.

A los efectos de seguir la curva de anticuerpos, se hicieron sangrías de todos los grupos, vacunados con las vacunas experimentales y el grupo vacunado con la vacuna usada como referencia, el día de la vacunación, 0 día y a los 25, 90 y 135 días postvacunación. En ese momento fueron revacunados con la misma vacuna y dosis que en la primera vez y las sangrías fueron repetidas a los 21, 90 y 135 días postvacunación (Gráfico 3).

#### Tercera serie

En este ensayo se produjeron 2 vacunas trivalentes con virus de conejo, a partir de las mismas suspensiones víricas. La única diferencia consistió en la concentración antigénica, que fue doble en la vacuna Exp 3/72 concentrada, que en la Exp 3/72, siendo el volumen de la dosis y los adyuvantes exactamente iguales. Tanto la adaptación de las cepas de virus a conejo lactante como la producción del virus fueron hechas en esta oportunidad en el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Como vacuna de referencia, se produjo una vacuna de tipo Frenkel inactivada con AEI.

*Suspensión vírica al 15% para las vacunas Exp 3/72 y Exp 3/72 concentrada*

Virus	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml	T.C.T. DI <sub>50</sub> /ml	pH
O <sub>1</sub>	1/30	10 <sup>7,9</sup>	10 <sup>8,4</sup>	7,5
A <sub>24</sub>	1/28	10 <sup>8,3</sup>	10 <sup>8,5</sup>	7,3
C <sub>3</sub>	1/20	10 <sup>7,9</sup>	10 <sup>8,3</sup>	7,7

a) Vacuna Exp 3/72. Cantidades para 1 litro. Dosis 5 ml.

Virus O - suspensión al 15% 200 ml  
 Virus A - suspensión al 15% 200 ml  
 Virus C - suspensión al 15% 200 ml  
 Inactivación 0,05% AEI durante 24 horas a 37° C.

Hidróxido de aluminio pH 8,3 400 ml  
 Glicerina neutra 50 ml  
 Saponina pH 8,0 0,1%  
 pH final de la vacuna 8,3

b) Vacuna Exp 3/72 concentrada. Dosis 5 ml.

Todo igual a la vacuna Exp 3/72 pero se usó doble cantidad de suspensión vírica y luego de dos días de contacto con el hidróxido de aluminio y sedimentación del mismo, se eliminó un volumen de líquido sobrenadante igual al 50% de la suspensión vírica usada.

*Suspensión vírica para la vacuna Exp 4/72. Virus Frenkel*

Virus	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml	T.C.T. DI <sub>50</sub> /ml
O <sub>1</sub>	1/12	10 <sup>7,3</sup> /ml	10 <sup>7,5</sup> /ml
A <sub>24</sub>	1/14	10 <sup>7,3</sup> /ml	10 <sup>7,1</sup> /ml
C <sub>3</sub>	1/22	10 <sup>7,96</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml

c) Vacuna Exp 4/72 (Virus Frenkel). Cantidades para 1,2 litros. Dosis 5 ml.

Virus O<sub>1</sub> 400 ml  
 Virus A<sub>24</sub> 400 ml  
 Virus C<sub>3</sub> 400 ml

Inactivación con AEI a 37° C durante 24 horas  
 Hidróxido de aluminio pH 8,3 800 ml

La mezcla se deja sedimentar en cámara fría durante 48 horas. Luego se elimina 800 ml de líquido sobrenadante. Así cada 1 ml de vacuna contiene el equivalente a 1 ml de suspensión vírica. Luego se adiciona:

Glicerina 60 ml  
 Saponina pH 8,0 0,1%  
 pH final de la vacuna 8,2

El Gráfico 4 muestra los resultados obtenidos a 0, 21, 90 y 135 días de la primera vacunación y a los 21 días después de la revacunación con estas 3 vacunas, aplicadas en sendos grupos de 16 bovinos, con una edad de 18 a 20 meses en el momento de la primera vacunación.

#### CONSERVACION DE LAS VACUNAS A 4° C, DURANTE PERIODOS PROLONGADOS

La vida útil de las vacunas conservadas a 4° C ofrece obvio interés y se ensayó con vacunas de la primera y segunda serie. Para ello se vacunó sendos grupos de 8 bovinos al 8° y 13° mes después de la elaboración, con las siguientes vacunas: virus conejo 4 ml de la primera serie; vacuna control BHK de la primera serie, y vacuna inactivada con formol, dosis 5 ml de la segunda serie.

El Gráfico 5 muestra los resultados expresados en ISP a los 21 días después de la vacunación.

En las vacunas de la primera serie vemos que, mientras la vacuna BHK mostró muy poca caída de su poder inmunogénico en sus dos valencias durante los 13 meses de su conservación a 4° C, la vacuna de virus conejo mostró una excelente conservación de su componente A<sub>24</sub> y una caída pronunciada de su componente O<sub>1</sub> desde el 8° mes.

En la vacuna de la segunda serie observamos una conservación normal de las tres valencias inclusive del componente O. En ambos casos el componente O era del subtipo O<sub>1</sub>, pero no la misma cepa.

#### CONSERVACION DE LA EFICACIA INMUNOGENICA DE LOS VIRUS DE CONEJO MANTENIDOS EN CONGELACION A -20° C

La forma habitual de conservar los virus producidos en conejo para su utilización en vacunas es en congelación a -20° C. Los Cuadros 8 y 9 muestran que los títulos infectantes y fijadores del complemento sufrieron muy poca variación en períodos de aproximadamente 1 año.

Para evaluar la eficiencia inmunogénica de esos virus, se produjo vacunas reproduciendo exactamente el protocolo de elaboración usado en la primera vez. El componente A de las vacunas de la primera serie mantuvo su poder inmunogénico inalterado, mientras

que el componente O ya había caído al 8° mes de conservación. En los virus de las vacunas de la segunda serie no hubo caída de ninguno de los tres virus (Gráfico 6).

#### 4. DISCUSION

En los ensayos preliminares se encontró que la adaptación del virus a conejos lactantes es fácil y se logra en pocos pases, lo que disminuye el riesgo de modificaciones indeseables del virus destinado a producción de vacunas inactivadas.

Las instalaciones y equipos necesarios para producción de vacunas por este método son mínimos.

La tecnología de la producción de vacunas por este método debe ser establecida por trabajos experimentales que abarquen todos los aspectos de la producción, desde los conejos lactantes y el virus de inoculación, hasta la vacuna final. El proceso de producción no puede ser simplemente copiado de técnicas de producción de vacunas que usan otras fuentes de antígeno. En los ensayos preliminares llevados a cabo en el CPFA se observaron grandes diferencias de resultados con pequeñas modificaciones de técnica.

Para los ensayos con vacunas se adoptó una técnica provisoria de producción de vacunas, adecuada para obtener la información preliminar sobre la eficacia inmunogénica de este tipo de antígenos, que es la meta de este trabajo. Es indudable que esta técnica puede y debe ser perfeccionada.

En algunas experiencias se usaron virus producidos en gran escala por firmas industriales, para que las vacunas fueran más representativas de este tipo de producción.

En la primera serie de experiencias se ve que la respuesta inmunitaria medida por anticuerpos circulantes, sube rápidamente después de vacunación, y decae también rápidamente. El mismo comportamiento se observa en la vacuna BHK usada como referencia.

En la segunda serie de ensayos, las vacunas elaboradas con las mismas suspensiones víricas e inactivadas con formalina y con AEI producen en general respuestas similares entre sí, y con las respuestas obtenidas con las vacunas de referencia. Los títulos más elevados obtenidos a los 21 días con la vacuna inactivada con formol y usada a la dosis de 10 ml, no mantuvieron la diferencia en la sangría de los 90 días postvacunación.

Es muy marcada la diferencia en la respuesta a los 21 días después de la primovacunación y después de la revacunación. La respuesta a la revacunación (efecto booster) es muy superior. Los índices previos inmediatos a ambas vacunaciones (0 días y 135 días) eran en muchos casos similares. Esta observación es una clara advertencia contra la norma de seleccionar bovinos para pruebas de vacunas en base solamente a su bajo

CUADRO 8. *Virus de conejo integral triturado usado en las vacunas de la primera serie*

Virus (susp. al 20%)	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml
Tipo A <sub>24</sub>		
1 mes	1/10	10 <sup>8,3</sup> /ml
8 meses	1/11	10 <sup>8,1</sup> /ml
13 meses	1/10	10 <sup>8,1</sup> /ml
Tipo O <sub>1</sub>		
1 mes	1/6	10 <sup>7,8</sup> /ml
8 meses	1/7	10 <sup>7,5</sup> /ml
13 meses	1/10	10 <sup>7,5</sup> /ml

CUADRO 9. *Virus de carcasa triturada usado en las vacunas de la segunda serie*

Virus (susp. al 15%)	F.C' 90' y 3 u C'	T.R.L. DI <sub>50</sub> /ml	T.C.T. DI <sub>50</sub> /ml
Tipo A <sub>24</sub>			
1 mes	1/15	10 <sup>8,0</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml
12 meses	1/15	10 <sup>7,9</sup> /ml	10 <sup>7,8</sup> /ml
Tipo O <sub>1</sub>			
1 mes	1/25	10 <sup>7,9</sup> /ml	10 <sup>8,1</sup> /ml
12 meses	1/25	10 <sup>7,1</sup> /ml	10 <sup>8,0</sup> /ml
Tipo C <sub>3</sub>			
1 mes	1/14	10 <sup>7,7</sup> /ml	10 <sup>8,3</sup> /ml
12 meses	1/20	10 <sup>7,6</sup> /ml	10 <sup>8,1</sup> /ml

tenor de anticuerpos, sin conocer bien sus antecedentes.

En la tercera serie de experiencias se confirman los resultados de las series anteriores. Una de estas vacunas, la Exp 3/72 concentrada, fue probada en la Unidad de Control de Rio Grande do Sul, por descarga directa de virus en bovinos, con resultados coincidentes con los obtenidos de seroprotección.

En las pruebas de conservación tanto de vacunas a 4° C, como de virus congelados, se observó que la misma es satisfactoria cuando se parte de antígenos de buena calidad. La labilidad del virus O usado en las pruebas de la primera serie tal vez se deba a una deficiencia específica de esa cepa, que demostró ser un antígeno sólo mediocre desde el primer momento. La mayor debilidad de algunas cepas de virus para su conservación luego de convertidas en vacunas es un hecho ya observado con algunas cepas de virus producidas por los métodos de Frenkel y en cultivos BHK.

Debido a que los estudios sobre la verdadera calidad inmunogénica de estos antígenos son recientes, las vacunas deben ser probadas sobre bovinos como los usados en estas experiencias. Las técnicas que usan otras especies animales o aquellas basadas en medición de fracciones de virus, sólo tendrán verdadera validez cuando sean padronizadas y establecidas sus relaciones con las técnicas que usan al bovino. Por otra parte, esas correlaciones deberán establecerse para cada cepa de virus, y tendrán validez mientras las técnicas de producción, tanto del virus como de las vacunas, no sean modificadas.

## 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se hicieron algunos ensayos preliminares de producción de virus en conejos lactantes, para ser usados como antígeno para vacunas. La adaptación del virus es fácil y se logra en pocos pasajes.

El virus multiplicado en conejo tiene bue-

nos títulos infectantes para ratones lactantes y cultivo de tejidos. El título fijador del complemento es en general excelente. Para obtener un buen virus es muy importante que los conejos hayan sido recientemente separados de sus madres y estar en óptimas condiciones físicas en el momento de su inoculación.

La suspensión vírica debe ser bien purificada por tratamiento con cloroformo u otro procedimiento similar y debidamente centrifugada.

Las suspensiones de virus multiplicado en conejos lactantes, al igual que las suspensiones víricas de Frenkel y BHK, se pueden inactivar bien, por la acción de la formalina o la AEI a las temperaturas habituales. En un ensayo sobre bovinos no se observó diferencia en la respuesta inmunitaria producida por las vacunas inactivadas con formalina o con AEI.

Las vacunas producidas fueron ensayadas en 20 grupos de bovinos vírgenes entre 15 y 20 meses de edad (194 bovinos en total), por vacunación primaria y revacunación, usando siempre vacunas de referencia producidas por otros métodos.

Vacunas producidas con concentraciones razonables de virus, y adyuvadas con  $Al(OH)_3$  y saponina producen una inmunidad (evaluada por respuesta de anticuerpos circulantes en bovinos vírgenes), que se puede considerar satisfactoria de acuerdo con las exigencias que establecen los reglamentos de control de vacuna.

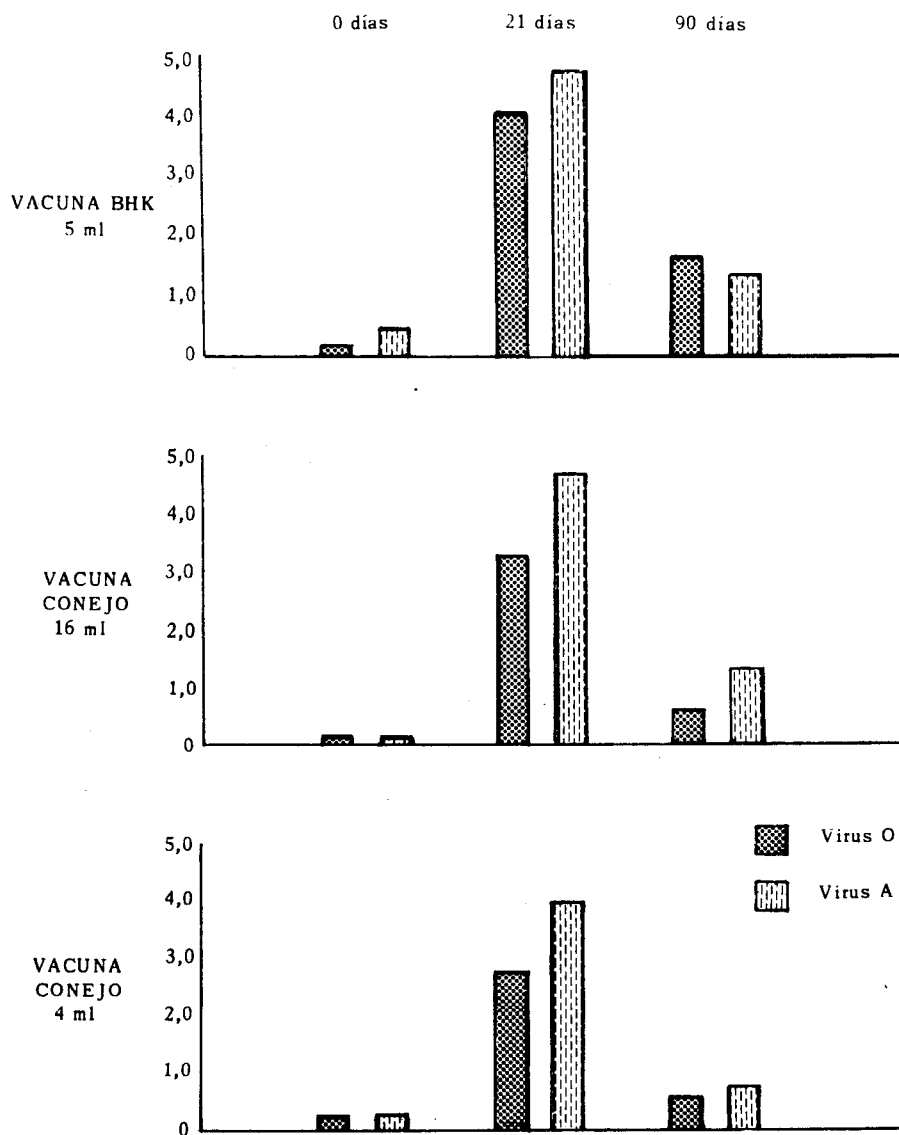
La vacuna Exp 3/72 concentrada fue probada en un ensayo posterior, por descarga directa de virus, en la Unidad de Control de GEFOFA en Rio Grande do Sul, con resultados coincidentes con las pruebas serológicas realizadas anteriormente.

La evolución de la curva de anticuerpos y el efecto de las revacunaciones con vacunas producidas con virus de conejos, coinciden en general con los resultados obtenidos con vacunas de tipo Frenkel o BHK usadas como referencia.

La conservación de las vacunas a 4° C fue buena durante 12 meses para una vacuna trivalente. Otra vacuna bivalente mantuvo su eficacia inalterada para la valencia A, no siendo así para la valencia O que cayó antes de los 8 meses.

La conservación del poder inmunogénico del virus congelado fue excelente durante 12 meses para 4 cepas de virus, siendo deficiente para una cepa de virus O, que se mostró débil desde el principio.

GRAFICO 1. *Medias de índices de seroprotección\**



\* Primera serie. Ensayo preliminar con vacunas conejo. Pasta integral (carcasa, cuero, cabeza). Se usa una vacuna BHK como referencia.

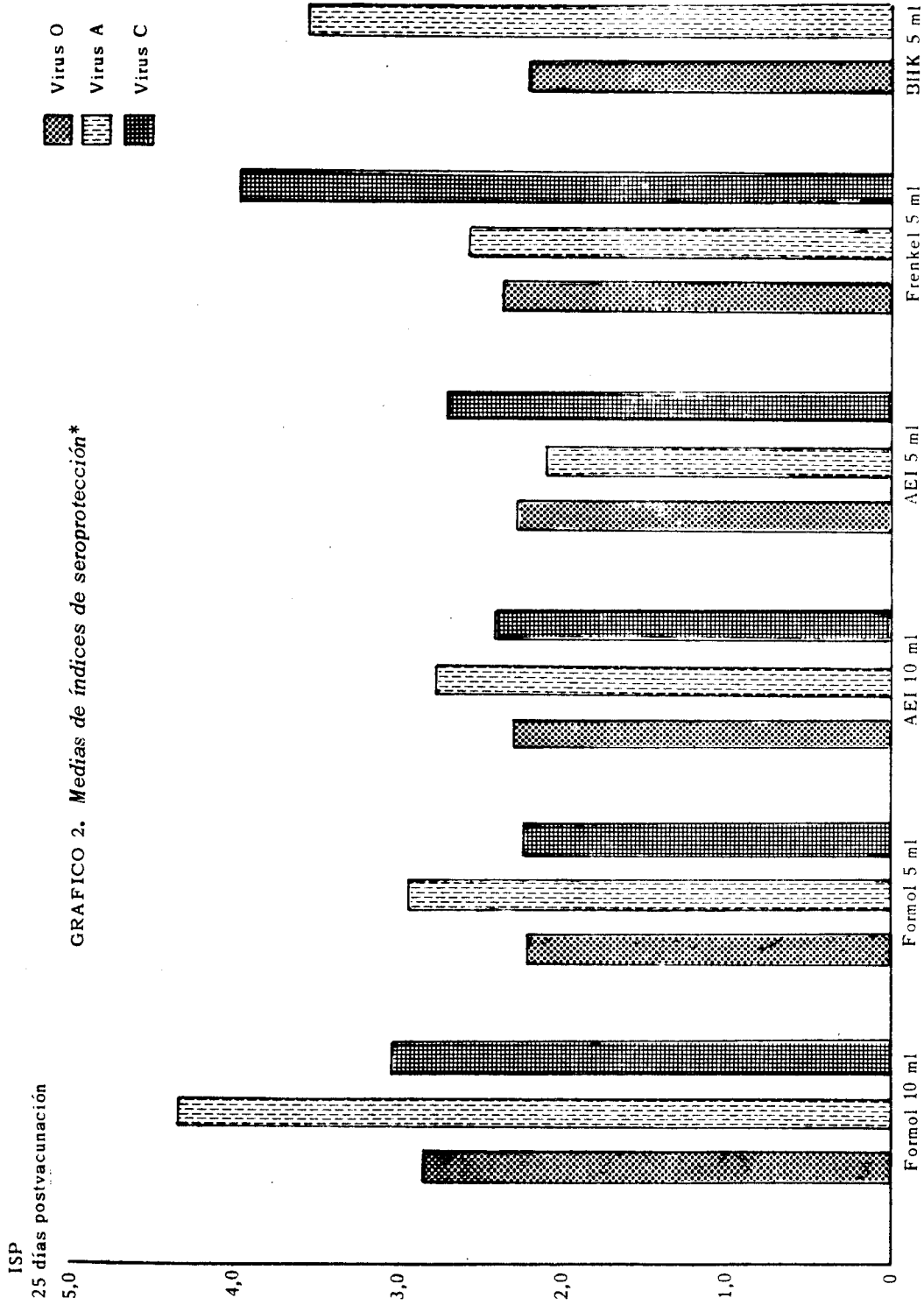
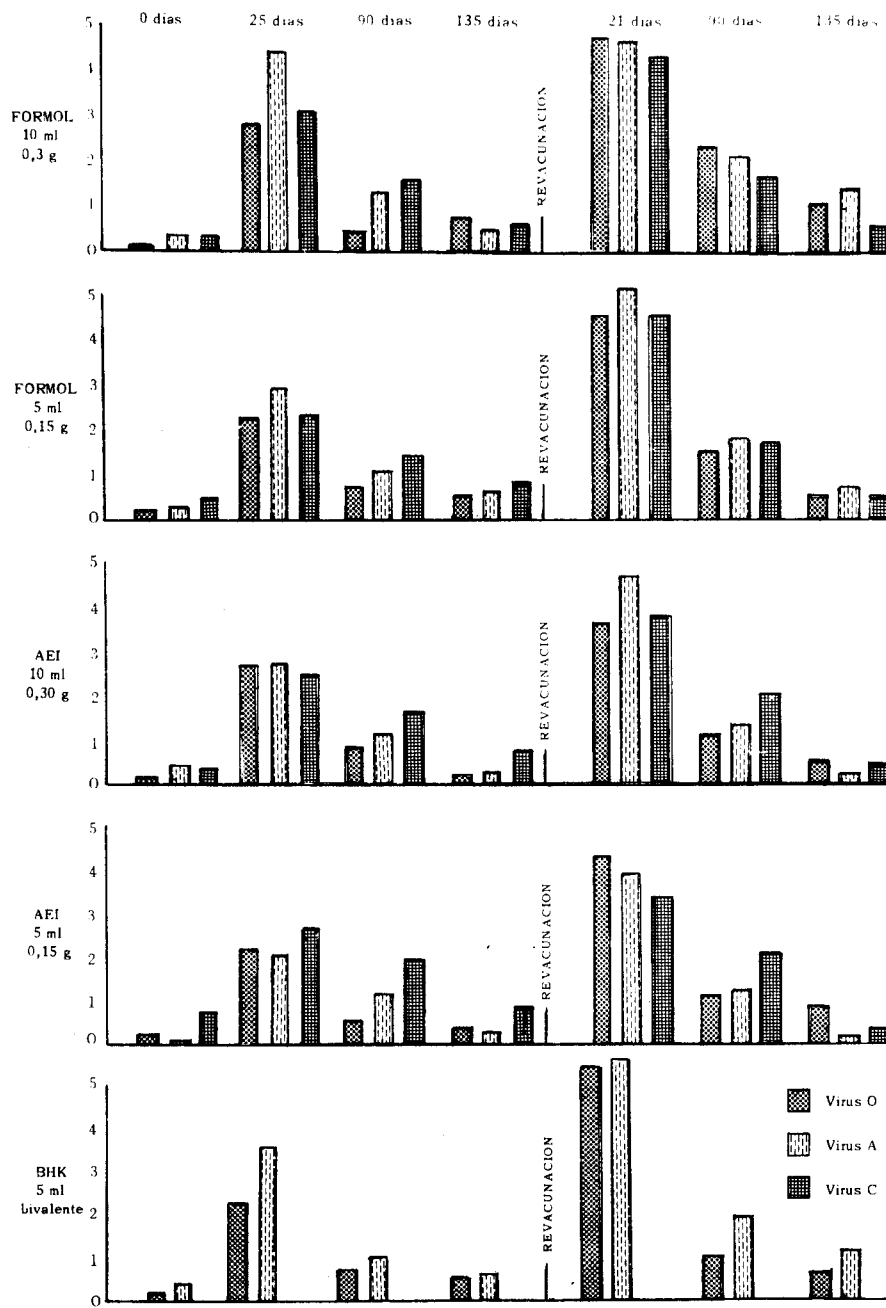


GRAFICO 2. Medias de índices de seroprotección\*

\* Segunda serie. Inmunidad producida por vacunas de virus conejo inactivadas con formol y con AEI a corto plazo. Se incluyen grupos vacunados con vacuna Frenkel y BIHK como referencia.

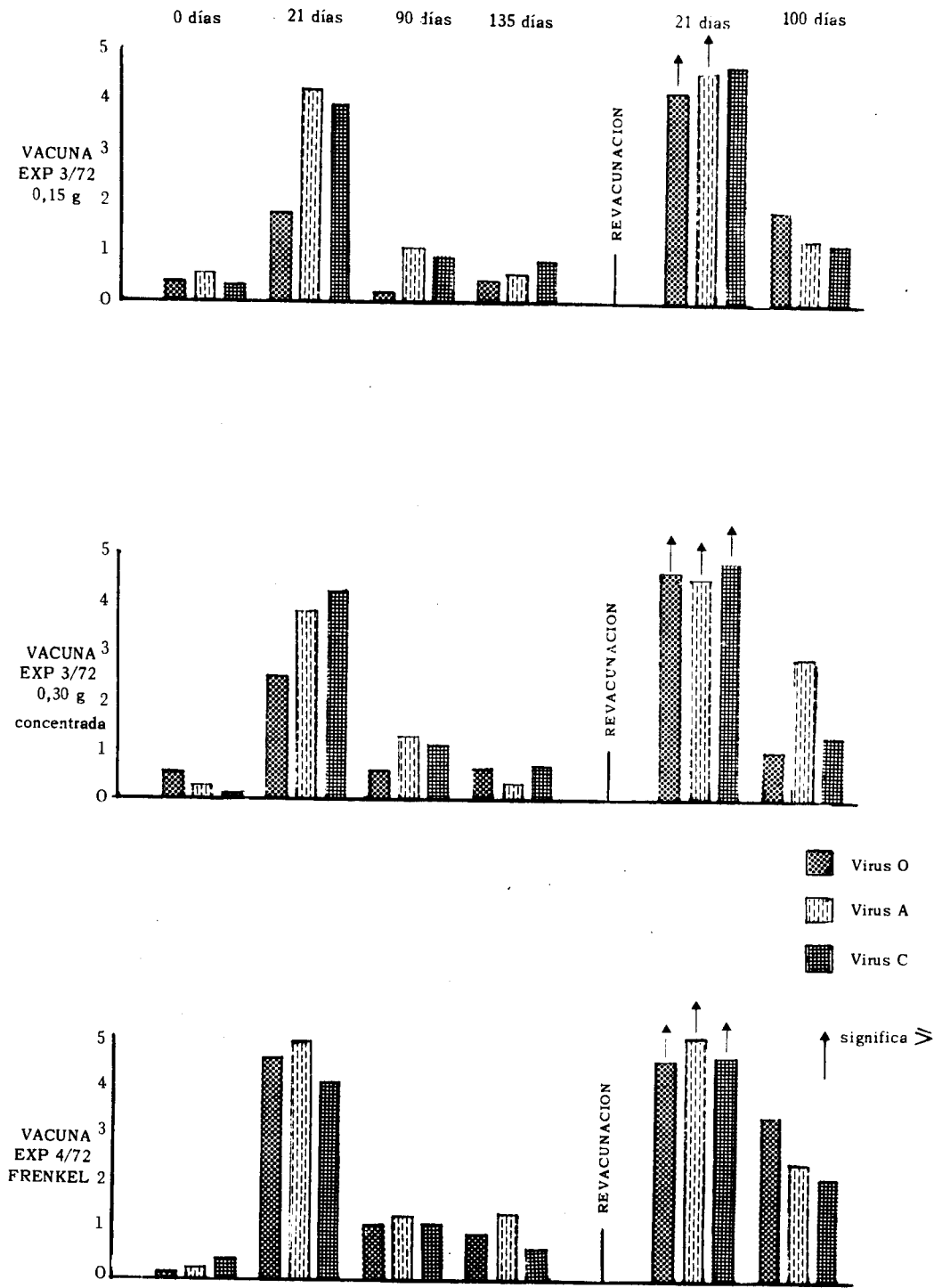
GRAFICO 3. Medias de índices de seroprotección\*



\* Segunda serie. Vacunas de conejo inactivadas con formol y con AEI. Duración de inmunidad y revacunación. Se usa una vacuna BHK como referencia.

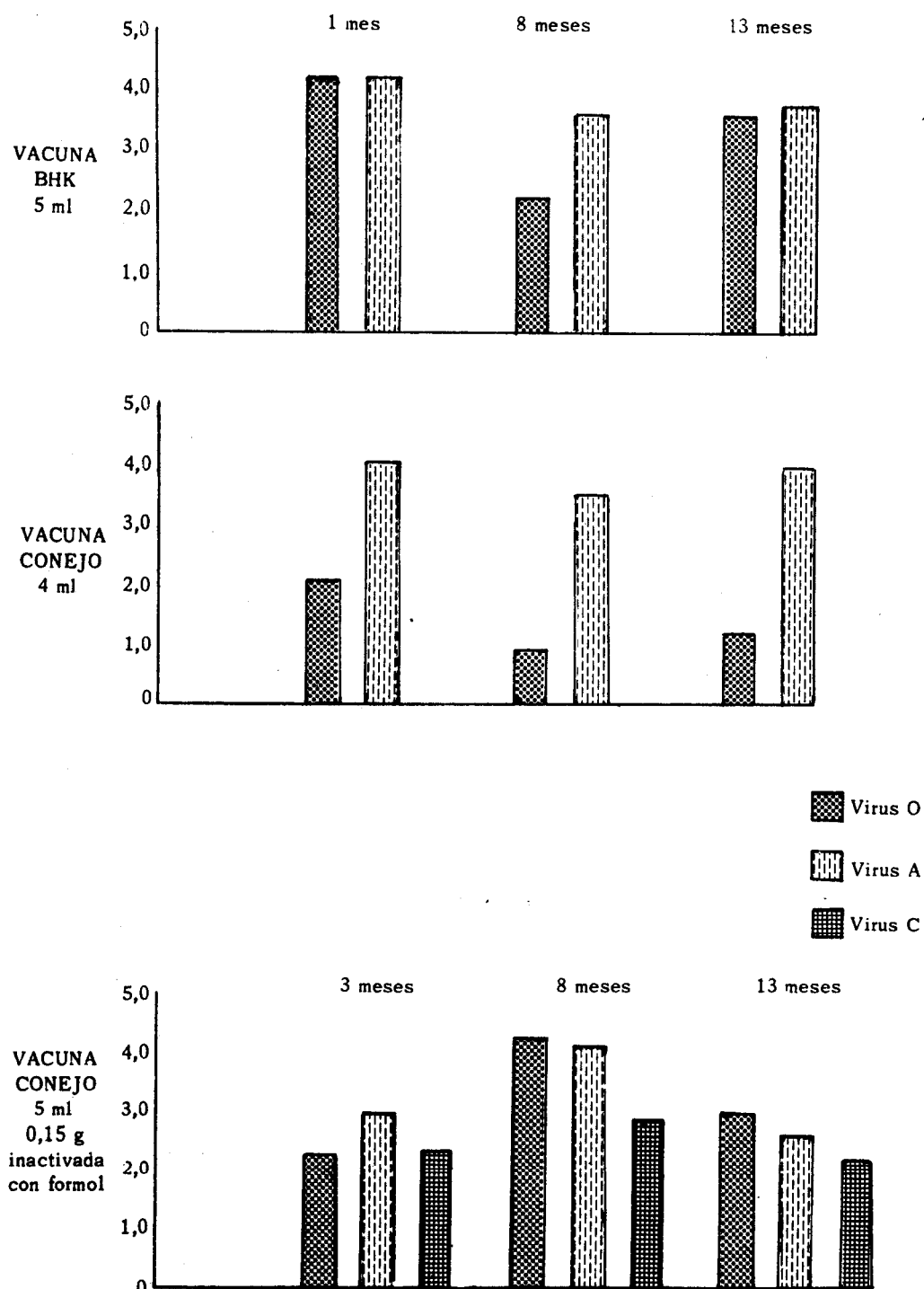


GRAFICO 4. Medias de índices de seroprotección\*

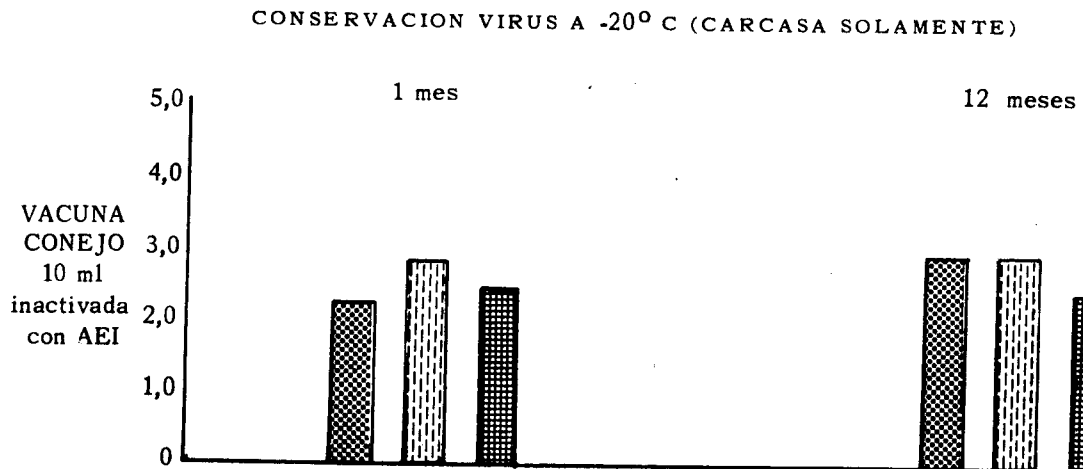
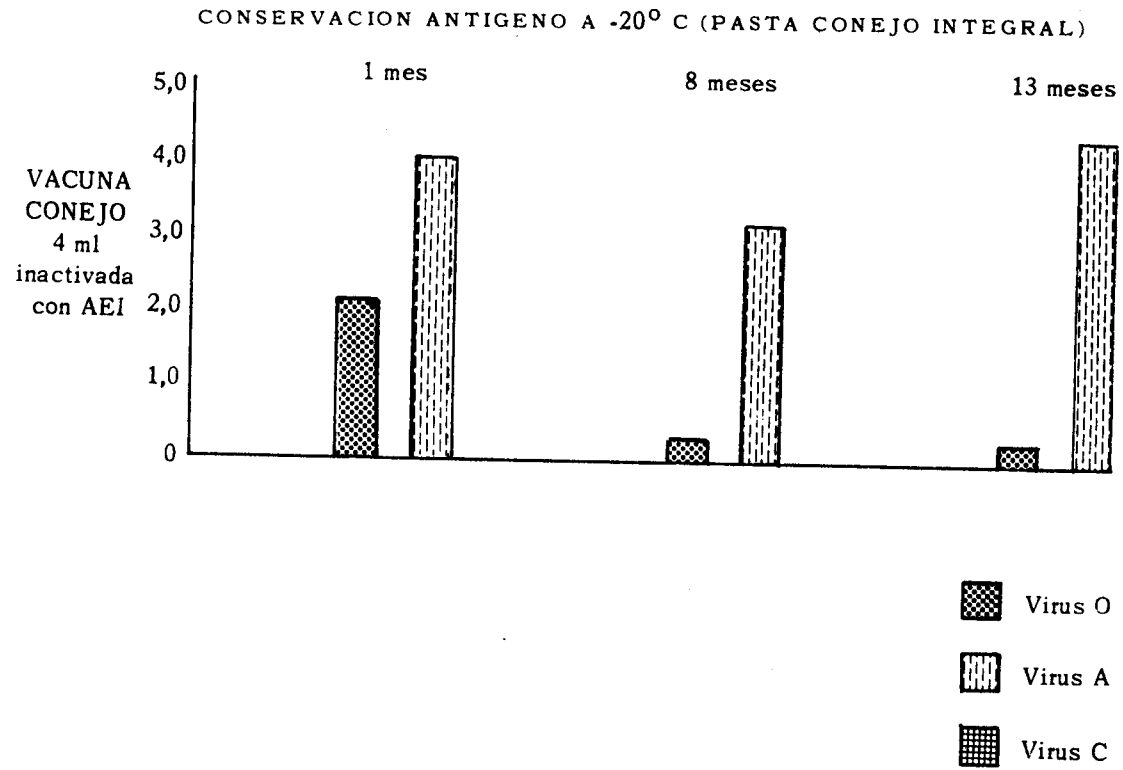


\* Vacuna conejo tercera serie. Duración de inmunidad y revacunación. Vacuna Frenkel como referencia.

GRAFICO 5. Medias de índices de seroprotección a los 21 días postvacunación\*



\* Conservación de vacunas BHK y virus conejo a 4° C.

GRAFICO 6. *Medias de índices de seroprotección a los 21 días postvacunación*

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. BOIKO, A.A. (Comparison of the immunogenic properties of foot-and-mouth disease vaccines). Texto en ruso. *Trudy naucho-kontrol. Inst. vet. Preparatov* 9: 39-42, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 1081, 1962).
2. DNEPROV, S.R., GOROKHAVA, M.P. (Experiences of the preparation and testing of lapinized foot-and-mouth disease vaccine between 1958 and 1961). Texto en ruso. *Trudy naucho-kontrol. Inst. vet. Preparatov* 10: 86-89, 1962. (*Vet. Bull.* 33: 2743, 1963).
3. KLIMOV, N.M., MALAKOHV, A.G., GRIBANOV, V.N. (Chemical purification of lapinized foot-and-mouth disease virus and trials of its antigenic and immunogenic properties). Texto en ruso. *Trudy vses. Inst. eksp. vet.* 24: 208-214, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 418, 1962).
4. LUTSEVICH, F.F. (Field trials of VIEV experimental lapinized foot-and-mouth disease vaccine). Texto en ruso. *Trudy vses. Inst. eksp. vet.* 25: 99-102, 1961. (*Vet. Bull.* 32: 1083, 1962).
5. SCHANG, P.J. *et al.* Utilización de los virus aftosos lapinizados como material antigénico para vacunas. *Gac. vet., B. Aires* 23: 370-374, 1961.
6. VERGÉ, J. *et al.* Culture de virus aphteux sur le lapin nouveau-né. Modification des pouvoirs pathogène et antigène. *Bull. Acad. vét. France* 30: 291-298, 1957.
7. VERGÉ, J. *et al.* Adaptation du virus aphteux au lapin nouveau-né. Essai de vaccination avec du tissu de lapin virulent. *Bull. Off. int. Épizoot.* 49: 93, 1958.
8. CUNHA, R.G. *et al.* El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet., B. Aires* 19 (110): 243-267, 1957.
9. ABREU MARTINS, I. de. Vacunas antiaftosas hidróxido-saponinadas inactivadas por el formol. *Bltm Centro Panamericano Fiebre Aftosa* 1: 1-19, 1971.